

古巴新拟盘多毛孢菌中 *NecArl8* 基因功能分析

毛青山^{1,2}, 王焕惟^{1,2}, 霍思燕^{1,2}, 董一鸣^{1,2}, 缪卫国^{1,2*}, 刘文波^{1,2*}

1 海南大学 热带农林学院, 热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海南 海口

2 海南大学, 儋州入侵生物海南省野外科学观测研究站, 海南 儋州

毛青山, 王焕惟, 霍思燕, 董一鸣, 缪卫国, 刘文波. 古巴新拟盘多毛孢菌中 *NecArl8* 基因功能分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3260-3276.

MAO Qingshan, WANG Huanwei, HUO Siyan, DONG Yiming, MIAO Weiguo, LIU Wenbo. Functional characterization of *NecArl8* in *Neopestalotiopsis cubana*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(7): 3260-3276.

摘要: 古巴新拟盘多毛孢菌(*Neopestalotiopsis cubana* Maharachch.)是番石榴(*Psidium guajava* L.)叶斑病和果实轮纹病的主要病原。ADP-核糖基化因子样蛋白 8 (ADP-ribosylation factor-like protein 8, *Arl8*)属于 ADP-核糖基化因子家族(ADP-ribosylation factor, *Arf*)超家族, 与溶酶体(定位、迁移、融合)功能相关。目前, *Arl8* 在植物病原真菌中的功能尚未明确。【目的】解析 *Arl8* 在古巴新拟盘多毛孢菌中的功能。【方法】从古巴新拟盘多毛孢菌基因组中筛选出一个 *Arl8* 基因, 命名为 *NecArl8*。采用规律成簇的间隔短回文重复序列系统及相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR-associated 9, CRISPR/Cas9)基因编辑技术构建 *NecArl8* 基因敲除突变体(Δ *NecArl8*)及回补菌株(Δ *NecArl8*-C), 并通过表型实验和 RNA-seq 转录组测序进行分析。【结果】与野生型相比, Δ *NecArl8* 产孢量下降 34.93%, 盐胁迫和渗透压胁迫抑制率分别显著提高 5.74% 和 7.39%, 致病力显著下降(病斑直径平均缩小 5.74 mm), 耐氧化胁迫能力显著增强(抑制率为-19.22%), 且长期培养后产生大量空泡细胞。对 Δ *NecArl8* 与野生型菌株进行 RNA-seq 测序, 差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)分析结果表明, 显著下调基因 2 330 个, 显著上调基因 1 355 个。基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)表明液泡跨膜转运蛋白广泛受到抑制, 16 个真菌型液泡相关蛋白表达量显著下降, 说明液泡的结构与功能完整性受到显著影响。逆转录实时荧光定量 PCR (reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR)验证结果表明, 随机选取的 9 个基因的表达水平与转录组测序数据趋势一致, 表明该转录组数据具有较高的可信度。【结论】*NecArl8* 可能通过调控跨膜转运功能进而影响古巴新拟盘多毛孢菌对番石榴的致病力, 可为探究该菌的致病机理及建立新的防治策略奠定理论基础。

资助项目: 国家自然科学基金(32560636); 海南省科技人才创新项目(KJRC2023B14); 海南省科技专项(ZDYF2024HXGG002)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32560636), the Hainan Provincial Science and Technology Talent Innovation Project (KJRC2023B14), and the Hainan Provincial Special Science and Technology Project (ZDYF2024HXGG002).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Wenbo, saucher@hainanu.edu.cn; MIAO Weiguo, miao@hainanu.edu.cn

Received: 2025-12-22; Accepted: 2026-02-26; Published online: 2026-03-02

关键词: 番石榴; 古巴新拟盘多毛孢菌; NecArl8; 功能分析

Functional characterization of *NecArl8* in *Neopestalotiopsis cubana*

MAO Qingshan^{1,2}, WANG Huanwei^{1,2}, HUO Siyan^{1,2}, DONG Yiming^{1,2}, MIAO Weiguo^{1,2*},
LIU Wenbo^{1,2*}

1 Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests of Ministry of Education, School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan, China

2 Danzhou Invasive Species Observation and Research Station of Hainan Province, Hainan University, Danzhou, Hainan, China

Abstract: *Neopestalotiopsis cubana* Maharachch. is the primary pathogen responsible for leaf spot and fruit ring rot in guava (*Psidium guajava* L.). The ADP-ribosylation factor-like protein 8 (Arl8) belonging to the ADP-ribosylation factor (Arf) superfamily is associated with lysosomal processes including localization, trafficking, and fusion. The function of Arl8 in phytopathogenic fungi remains poorly understood. **[Objective]** To elucidate the function of Arl8 in *N. cubana*. **[Methods]** An *Arl8* gene was identified from the genome of *N. cubana* and designated as *NecArl8*. A *NecArl8* knockout mutant (Δ *NecArl8*) and a complemented strain (Δ *NecArl8*-C) were generated via clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated 9, (CRISPR/Cas9)-mediated genome editing. These strains were subsequently analyzed through phenotypic experiments and RNA-seq. **[Results]** Δ *NecArl8* showed a reduction of 34.93% in sporulation capacity and significant increases of 5.74% and 7.39% in inhibition rates by salt and osmotic stresses, respectively. In addition, this mutant exhibited weakened pathogenicity, as indicated by a reduction of 5.74 mm in the average spot diameter. In contrast, the mutant displayed significantly enhanced resistance to oxidative stress, which showed an inhibition rate of -19.22%. After long-term culture, a large number of vacuolated cells were observed in the mutant. RNA-seq analysis was performed on Δ *NecArl8* and the wild-type strain to identify differentially expressed genes. Transcriptomic analysis showed that 2 330 genes were significantly down-regulated and 1 355 genes were significantly up-regulated. Gene set enrichment analysis further revealed that transmembrane transport proteins were broadly suppressed, and the expression levels of 16 fungal-type vacuolar-related proteins were significantly down-regulated, suggesting that the structure and functions of fungal-type vacuoles were seriously damaged. The reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) results showed the expression patterns of 9 randomly selected transmembrane transport genes were consistent with those obtained by transcriptome sequencing, indicating that the transcriptome data were highly reliable. **[Conclusion]** *NecArl8* may affect the pathogenicity of *N. cubana* on guava by regulating function of transmembrane transport. This study lays a theoretical foundation for exploring the pathogenic mechanism of *N. cubana* and developing new

control strategies.

Keywords: *Psidium guajava*; *Neopestalotiopsis cubana*; NecArl8; functional characterization

古巴新拟盘多毛孢菌 (*Neopestalotiopsis cubana* Maharachch.) 是一种广泛分布的植物病原菌^[1], 可侵染植物从生长期到果实采后贮藏期的全生产阶段, 引发番石榴果腐病、莲雾软腐病、草莓根腐病、槟榔叶斑病等多种植物病害^[2-4]。在番石榴贮藏期发病率约 30%^[5], 草莓根腐病发病率达 15%–20%^[6], 造成严重的经济损失。研究古巴新拟盘多毛孢菌的致病机制并探索新的绿色防控策略具有重要的科学意义和实际价值^[7]。

ADP-核糖基化因子样蛋白 (ADP-ribosylation factor-like proteins, Arl) 属于大鼠肉瘤 GTP 酶 (rat sarcoma GTPase, Ras)/ADP-核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, Arf) 超家族的重要分支, 是一类高度保守的小 GTP 结合蛋白 (small GTPases), 其核心功能是通过与三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP) 结合 (激活态) 或与二磷酸鸟苷 (guanosine diphosphate, GDP) 结合 (失活态) 的构象变化, 作为“分子开关”调控细胞内多种关键生理过程^[8]。Arl 亚家族序列同源性高度保守, 但功能谱系已显著分化, 其中 ADP-核糖基化因子样蛋白 8 (ADP-ribosylation factor-like proteins 8, Arl8) 定位于溶酶体膜, 核心功能为调控溶酶体动态 (定位、迁移与融合) 及细胞自噬水平, 但在不同物种间其功能已产生特异性分化^[9-11]。Arl8 蛋白在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中通过调控溶酶体与内吞体融合维持细胞内稳态及清除能力, 也可直接与驱动蛋白结合调控溶酶体迁移^[12]; 在人类和小鼠细胞中 Arl8 是细胞自噬降解终末阶段的关键调控因子; 在 HeLa 细胞等模型中发现, 抑制 Arl8 可特异性促进前列腺癌细胞自噬, 因此 ARL8B 被认定为可用于精准医疗的新型抗前列腺癌药物靶标^[13]; ARL8B 在拟南芥中的同源蛋白 ARLA1A 则演化出对 ABA 胁迫处理的特异响应^[14]。已有研究表明, Arl8 可被病原微生物

劫持, 在 HeLa 细胞感染沙门氏菌的过程中^[15]及番茄花叶病毒 (tomato mosaic virus, ToMV) 感染中^[16-17]病原体均利用 Arl8 的膜运输调控功能促进自身生存与增殖。

目前, 关于真菌中 Arl8 功能的研究较少。已有研究对稻瘟病菌 Arl8 功能进行了初步表型描述: 通过敲除 Arl8 同源基因获得突变体 (Δ Moarl8), 表型分析表明 MoArl8 对稻瘟病菌营养生长和发育非必需, 致病力未明显受损; 进一步研究发现 MoArl8 与适配蛋白 MoGga1 无直接互作, 其功能可能独立于已知的囊泡运输通路^[18]。现有文献中, 植物病原真菌 Arl8 基因的功能研究主要依赖序列同源性推测其可能参与溶酶体运输, 尚缺乏实验验证^[19]。

本研究以古巴新拟盘多毛孢菌中含 Arl8 结构域的蛋白为研究对象, 通过规律成簇的间隔短回文重复序列系统及相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR-associated 9, CRISPR/Cas9) 基因组编辑技术结合 Split Marker 同源重组法对 *NecArl8* 基因进行敲除, 并结合表型实验与 RNA-seq 转录组测序分析, 探讨 *NecArl8* 在古巴新拟盘多毛孢菌中的功能, 以期为防控该菌引起的植物病害提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和质粒

古巴新拟盘多毛孢 PHWZS16 菌株从海南省五指山市番石榴病果中分离、鉴定获得; pCX62、pYF515、pKNTG 等质粒由热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室保存; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。

土豆、番石榴, 海南致微科技贸易有限公

司; T4 DNA 连接酶, TaKaRa 公司; DNA 限制性内切酶, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 同源重组连接酶, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒提取、DNA 片段回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。引物均合成自北京六合华大基因科技有限公司广州分公司, 引物序列如表 1 所示。

表1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Primer names	Primer sequences (5'→3')
NecArl8_SgRNA200	GAGATGGACGTGACTATGAT	NecArl8_SgRNA740	GCCCTGTCGTTGAAGAGCAT
NecArl8_SgRNA470	AATATGAAGAAGGTGACTCG		
NecArl8_200F	CTAGCCATCTCCTGATGAGTCCGTGAGGAC GAAACGAGTAAGCTCGTCGAGATGGACGT GACTATGAT	NecArl8_200R	AAACATCATAGTCACGTCCATCTCGACGAG CTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG GAGATGG
NecArl8_470F	CTAGCCATATTCTGATGAGTCCGTGAGGAC GAAACGAGTAAGCTCGTCAATATGAAGAAG GTGACTCG	NecArl8_470R	AAACCGAGTCACCTTCTTCATATTGACGAG CTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG AATATGG
NecArl8_740F	CTAGCCAGGGCCTGATGAGTCCGTGAGGAC GAAACGAGTAAGCTCGTCGCCCTGTCGTTG AAGAGCAT	NecArl8_740R	AAACATGCTCTTCAACGACAGGGCGACGAG CTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAG GCCCTGG
NecArl8_AF	AGGGAACAAAAGCTGGGTACTTCGGCTCTT GTAATCTCGTCAC	NecArl8_AR	CTAGTCCAGCGGCGCGCCGGTTGCGCTCG GTTCTGAAG
NecArl8_BF	GATGCCGACCGGGCCGGCCGGTTCCACGGC GGCTTATG	NecArl8_BR	CCACCGCGGTGGCGGCCGCTGCCTTGCACT CCATGTCTTG
NecArl8_ORFF	GCCAGGACGCCTCTTTAGT	NecArl8_ORFR	TTTGTTACCCAGAACGAGCA
NecArl8_seqF	ACCTTGCCCTTACATACCTCCC	NecArl8_seqR	GCCGTCTCAACTATCACCGA
NecArl8_UahF	CAATAGCACTTACCCTGCCTCA	NecArl8_UahR	GCTCCATACAAGCCAACCAC
25760-F	GGGTCTTAATCTGGGAGGAAA	25760-R	GGAGGACGGTTTGAAGTAGA
72720-F	GTTGAATCGGGAATACCAGTTG	72720-R	GATGCGTTTACGAGGGAGC
075210-F	CCGATGCCGAAATCATAAAG	075210-R	CCGCCTAAGTAGAGGTAGAAATG
007190-F	GATGGTATGGGACTCACAGCC	007190-R	GACGCACGATACGAAGCAG
061140-F	CCTATTGACGGCAACCCA	061140-R	GACTGTTGATAAGCACTATGAAAGC
066530-F	AGCGTCAGACAATGCCTCC	066530-R	GAACCAATACTCCAGCTCCGT
015890-F	AGGAAATCCGACATCACCG	015890-R	CCGACTTGTAGCCAATAGAGC
118890-F	CCGATAACGAGTCCAAGCG	118890-R	GGCAGTCTTCTTCTGGGCAT
093710-F	GACATTGCCACCATTGATAAGA	093710-R	TTCTCGCCCGAGTACGTGATGTAGA

1.2 含 Arf 结构域的致病相关蛋白筛选

本研究使用的古巴新拟盘多毛孢 PHWZS16 菌株及全基因组数据、侵染转录组数据均来自本实验室前期分离、测序^[20]。从 PHWZS16 菌株的全基因组数据获得包含 15 728 个蛋白质的序列集(FASTA 格式)。从 Pfam 数据库[Pfam is now hosted by InterPro (<http://pfam.xfam.org/>)]下

载 Arf 结构域的隐马可夫模型(hidden Markov model, HMM) (登录号为 PF00025), 使用 HMMER 软件 *hmmsearch* 命令将蛋白质序列集与登录号为 PF00025 的模型进行比对, 保留结构域匹配 $E\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$ 的序列, 最终得到 34 个含 Arf 结构域的候选蛋白。将 34 个含 Arf 结构域的候选蛋白, 通过 InterProScan 在线工具 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) 进一步验证结构域的准确性, 筛选出 7 个仅含单一 Arf 结构域的候选蛋白。进一步结合 PHWZS16 菌株侵染番石榴果实过程中第 3 天和第 6 天表达量差异倍数最大的目标蛋白 Neopbctg000000002G00058730。

1.3 NecArl8 蛋白的生物信息学分析

利用 SMART 在线工具 (<http://smart.emblheidelberg.de/>) 和 InterPro 在线工具 (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 对 Neopbctg000000002G00058730 蛋白的保守功能域进行分析, 确定其结构特征为 Arl8, 因此命名为 NecArl8。使用 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)、TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 等对其进行理化性质、亲水性/疏水性分布、信号肽、跨膜结构域进行分析; 同时将 NecArl8 蛋白序列在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLASTp 检索, 获得与 NecArl8 亲缘关系较近的蛋白序列, 利用 MEGA-11 软件采用最大似然法进行系统发育分析, 自举分析 1 000 次构建系统发育树。

1.4 PHNWZS16 菌株基因组 DNA 提取

PHNWZS16 菌株接种于马铃薯葡萄糖液体培养基(potato dextrose broth, PDB), 于 28 °C、180 r/min 振荡培养 2 d, 过滤收集菌丝体用于基因组 DNA 提取, DNA 提取采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法。

1.5 NecArl8 基因敲除载体的构建及转化子验证

以提取的 PHWZS16 菌株基因组 DNA 为模板, NecArl8_AF/NecArl8_AR 和 NecArl8_BF/NecArl8_BR 为引物分别对 NecArl8 基因的上、下游序列进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 模板 1 μL, 加 ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 32 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保温。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后回收 PCR 产物。同时将 pCX62 克隆载体分别用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 组合进行酶切, 并将回收的 PCR 产物分别连接于 pCX62 载体中, 最后分别用引物 NecArl8_AF/HY-R 和 YG-F/NecArl8_BR 大量扩增目的片段, 并使用通用型 DNA 纯化回收试剂盒回收, 获得同源重组片段。根据前人的方法^[21], 将 PHWZS16 菌株 *NecArl8* 基因序列利用单链向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA) 在线设计工具 (grna.ctegd.uga.edu) 设计 3 个靶向 *NecArl8* 的 sgRNA, 将其合成并克隆至 pYF515 (构建方法同上)。通过聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG) 介导的原生质体转化和同源重组的方法, 将 sgRNA 和抗性片段转入野生型 PHNWZS16 的原生质体中, 在含有潮霉素的胰蛋白胨酵母提取物肉汤 3 号培养基 (tryptone yeast extract broth 3, TB3) 平板上进行阳性转化子筛选, 通过 PCR 扩增和测序验证成功敲除的转化子(引物序列见表 1)。

1.6 回补菌株 Δ*NecArl8*-C 的获得

以野生型 DNA 为模板, 用引物扩增 *NecArl8* 基因及其自身启动子序列, 构建 *NecArl8* 基因回补载体 pKNTG, 同时设计靶向 *HPH* 的 sgRNA, 并将其克隆到 pYF515。将回补载体与 sgRNA 导入敲除株中, 在含有 G418 的 TB3 平板培养基上进行筛选, 参照 1.5 节中相同的 PCR 方法验证回补是否成功。

1.7 生长速率测定及长期培养实验

将待测菌株分别接种于完全培养基(complete medium, CM)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar medium, PDA 培养基)(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司)平板上, 28 °C培养 6 d 后测量菌落直径。实验重复 3 次, 数据取平均值并进行统计分析。使用 CM 液体培养基于 28 °C、180 r/min 培养 15 d 后, 在光学显微镜下观察菌丝形态, 通过透射电镜观察细胞内部情况。

1.8 分生孢子形态观察及产孢量测定

将待测菌株分别接种于 PDA 平板上, 28 °C 培养 10 d 后, 用无菌蒸馏水轻轻刮取菌落表面的孢子并收集悬浮液。通过滤纸过滤以去除菌丝碎片后, 用血球计数板计数分生孢子的数量, 计算每平板的产孢量。同时, 制备孢子悬液涂片, 在显微镜下观察孢子的形态。每个菌株重复 3 次实验, 数据取平均值。

1.9 致病力测定

将待测菌株分别培养于 CM 液体培养基, 28 °C、180 r/min 培养 2 d 后, 28 °C、12 000 r/min 离心 2 min 收集菌丝。对健康的番石榴果实使用打孔器造伤, 将菌丝正面覆盖在造伤处, 以未接种菌丝的 CM 培养基作为阴性对照。接种后, 将果实置于 28 °C、保湿条件下培养, 接种 3、6、9 d 分别记录病斑直径。

1.10 环境胁迫测定

将待测菌株分别接种于含 CM 培养基的平板上, 在培养基中分别添加不同胁迫试剂: 1 mol/L 山梨醇、0.6 mol/L NaCl、0.01% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、200 µg/mL 刚果红(Congo red, CR)、20 µg/mL 荧光增白剂(calcofluor white, CFW)和 3 mmol/L H₂O₂, 添加等量的无菌水的 CM 培养基作为对照。将直径 5 mm 的菌饼接种于平板中央, 置于 28 °C 培养 6 d, 采用十字交叉法测定菌落直径并拍照记录。实验设置 3 个生物学重复, 计算胁迫处理与对

照组的生长抑制率, 如公式(1)所示。

$$\text{抑制率} = (1 - \frac{\text{处理组菌圈平均直径(T)}}{\text{对照组菌圈平均直径(CK)}}) \times 100\% \quad (1)$$

1.11 RNA-seq 测序

将野生型 PHNWZS16、基因敲除株 Δ *NecArl8* 分别使用 CM 液体培养基 28 °C、180 r/min 培养 2 d, 过滤收集菌丝, 使用液氮速冻后送上海欧易生物医学科技有限公司进行真核有参转录组测序。富集分析均在欧易在线分析平台(<https://cloud.oebiotech.com>)进行。RNA-seq 测序结果进行质量检验, 将基因表达量进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。筛选出显著差异的基因进行进一步分析[$Q\text{-value} < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change}| > 1$, 即统计显著且基因表达变化倍数(fold change, FC) ≥ 2]。

1.12 RT-qPCR 验证

在显著差异的基因中随机选取 9 个基因设计逆转录实时荧光定量 PCR (reverse transcription quantitative PCR, RT-qPCR)引物进行基因表达量分析, 相关引物序列见表 1。

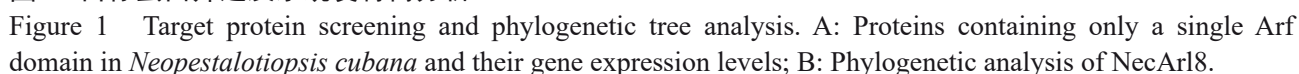
1.13 数据处理

采用 Microsoft Office 2019 和 Graphpad Prism 10.1.2 软件对试验数据进行统计分析和绘图。以 t 检验($t\text{-test}$)进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *NecArl8* 蛋白的筛选及生物信息学分析

使用 HMMER 软件从 PHWZS16 菌株的全基因组中筛选出 7 个仅含单一 Arf 结构域的候选蛋白, 选取侵染果实过程中表达量差异倍数最大的目标蛋白, 经分析确定其结构特征为 *Arl8*, 因此命名为 *NecArl8* (图 1A)。*NecArl8* 基因编码 182 个氨基酸, 理论分子量约 20.37 kDa, 理论等电点(isoelectric point, pI)为 6.30, 分子式为 C₉₁₆H₁₄₆₀N₂₄₄O₂₆₀S₁₀, 总原子数 2 890 个。理化



性质分析表明, 该蛋白不稳定性指数为 21.74, 属于稳定蛋白; 信号肽预测结果显示该蛋白被高度可信地预测为“无典型的信号肽”, 为非分泌性蛋白。TMHMM 预测结果显示无跨膜螺旋结构, 为典型的可溶性蛋白。结果表明 *NecArl8* 是一个经典的可溶性胞内信号转导蛋白, 与结构域预测功能一致。系统发育树清晰呈现了 *Arf* 相关蛋白在子囊菌门真菌中的进化脉络, 物种集中于子囊菌门真菌[已上传 ScienceDB 数据库 (<http://www.scidb.cn>), 中国科技资源标识 (chinese science and technology resource identifier, CSTR) 编号为 <https://cstr.cn/31253.11.sciencedb.j00231.00036>], 说明 *NecArl8* 蛋白在子囊菌中具有高度进化保守性(图 1B)。

2.2 构建敲除突变体菌株

利用 CRISPR/Cas9 及 Split Marker 技术构建 *NecArl8* 基因敲除突变体 $\Delta NecArl8$ 。在含潮霉素的平板上筛选获得转化子, 经多对引物 PCR 验证, 筛选获得一株突变体 $\Delta NecArl8$ (图 2)。如图 2A 所示, 初筛使用 *NecArl8_ORFF/NecArl8_ORFR* 引物验证, $\Delta NecArl8$ 未扩出条带(泳道 2), 野生型菌株基因组和 EV 空载对照组扩增出一条 551 bp 的条带(泳道 3、泳道 4); 如图 2B 所示, 复检使用 *NecArl8_UahF+NecArl8_UahR* 引物验证 $\Delta NecArl8$ 扩增出 1 条约 2 851 bp 的目的条带(泳道 4), 而野生型 PHNWZS16 菌株和 EV 空载对照菌株无条带(泳道 2、泳道 3)。使用 *NecArl8_seqF/NecArl8_seqR* 引物扩增敲除区域

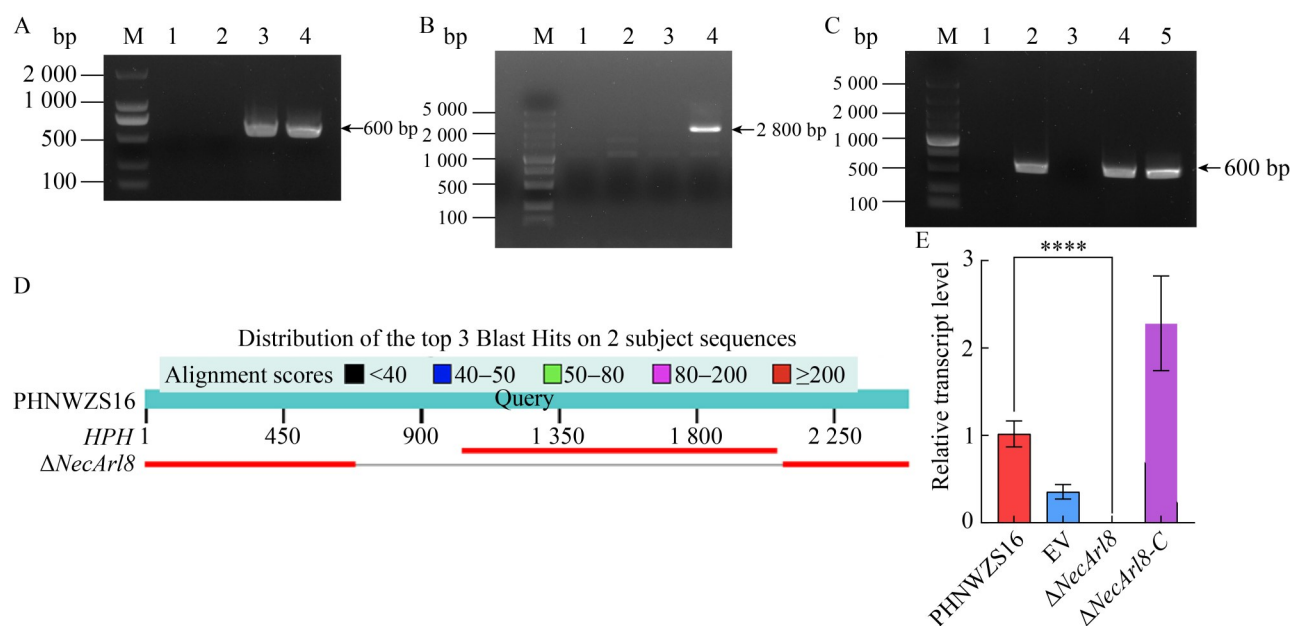


图2 *NecArl8*基因敲除和回补的PCR验证及测序鉴定

Figure 2 PCR verification and sequencing identification of *NecArl8* gene knockout and complementation. A: Verification of $\Delta NecArl8$ knockout transformants using primers *NecArl8_ORFF/NecArl8_ORFR* (Lane M: Molecular marker; Lane 1: CK; Lane 2: $\Delta NecArl8$; Lane 3: EV; Lane 4: PHNWZS16); B: Verification of knockout transformants using primers *NecArl8_UahF/NecArl8_UahR* (Lane M: Molecular marker; Lane 1: CK; Lane 2: EV; Lane 3: PHNWZS16; Lane 4: $\Delta NecArl8$); C: Verification of complementation transformants *NecArl8_ORFF/NecArl8_ORFR* (Lane M: Molecular marker; Lane 1: CK; Lane 2: $\Delta NecArl8$ -C; Lane 3: $\Delta NecArl8$; Lane 4: EV; Lane 5: PHNWZS16); D: Sequencing alignment results of knockout transformants; E: RT-qPCR analysis (****: $P < 0.0001$).

送北京六合华大基因科技有限公司广州分公司测序,经 NCBI BLAST 比对表明,所验证的转化子即为 *NecArl8* 基因敲除突变体(图 2D)。

通过原生质体转化法将构建的 pKNTG-*NecArl8* 质粒载体转入 Δ *NecArl8* 中获得异位转化子 Δ *NecArl8*-C, 利用引物 *NecArl8*_ORFF/*NecArl8*_ORFR 进行验证, Δ *NecArl8* 中未检测到扩增条带(泳道 3), 而回补转化子 Δ *NecArl8*-C (泳道 2)、PHNWZS16 (泳道 5)和 EV (泳道 4)均可扩增到一条约为 551 bp 的目的条带,说明目的基因序列已重新转入,获得回补菌株 Δ *NecArl8*-C (图 2C)。RT-qPCR 验证结果表明,敲除和回补菌株均验证正确,可用于后续实验

(图 2E)。

2.3 古巴新拟盘多毛孢菌 Δ *NecArl8* 菌株的表型观察

2.3.1 生长速率分析及长期培养实验分析

在 PDA、CM 这 2 种不同培养基上对 Δ *NecArl8* 菌株的菌落形态及直径进行观察和测量。结果显示,与野生型 PHNWZS16 菌株相比, Δ *NecArl8* 菌株的菌落形态和生长速度均未表现出显著差异(图 3A、3B)。这一结果表明, *NecArl8* 基因的缺失并未对古巴新拟盘多毛孢菌的菌落形态及营养生长能力产生明显影响。使用 CM 液体培养基 28 °C、180 r/min 培养 15 d

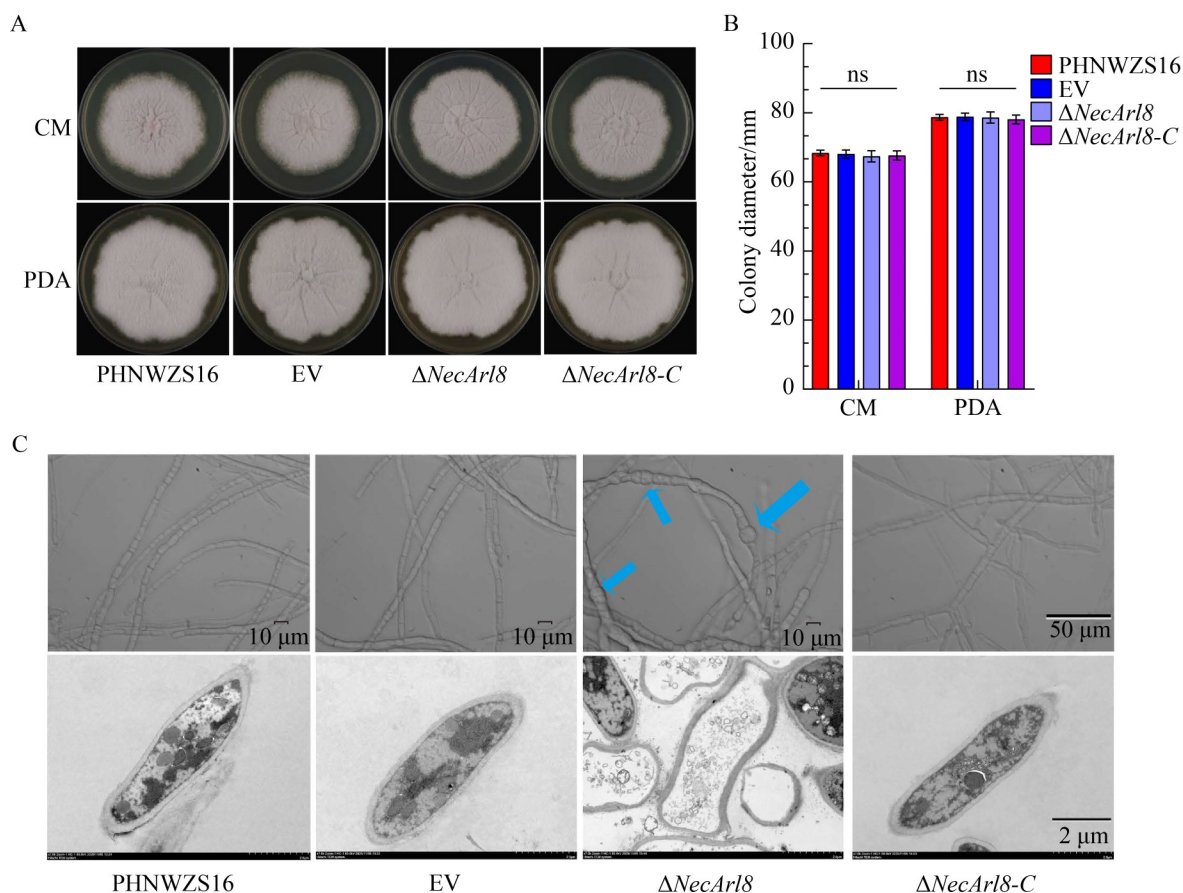


图3 菌落生长表型观察

Figure 3 Observation of colony growth phenotype. A: Colony morphology of the strains on nutrient medium; B: Colony diameter statistics; C: Mycelial morphology under long-term culture experiment (Magnification: 1 000 $\times$, scale bar=50 μ m. Electron microscope magnification: 7 000 $\times$, scale bar=2 μ m). ns: $P>0.05$.

后观察菌丝形态,发现 PHNWZS16、 $\Delta NecArl8$ 、EV、 $\Delta NecArl8-C$ 均出现相似情况的根部菌丝膨大、菌丝尖端皱缩、大量破碎细胞。然而,突变体 $\Delta NecArl8$ 中存活的菌丝更少,膨大更为显著且出现大量空泡细胞,透射电镜观察到突变体中聚集大量空泡(图 3C)。

2.3.2 产孢量及孢子形态分析

显微镜观察发现, $\Delta NecArl8$ 的分生孢子形态与野生型菌株相比无显著差异,但 $\Delta NecArl8$ 的产孢量显著低于野生型菌株,回补后孢子数量恢复(图 4A、4B)。由此可见, *NecArl8* 基因的缺失未影响古巴新拟盘多毛孢分生孢子的大小和形态,但对产孢能力具有显著影响。

2.3.3 致病力测定分析

在健康番石榴果实上分别接种供试菌株,于 3、6、9 d 分别测量病斑直径。结果显示,与野生型菌株 PHNWZS16 相比, $\Delta NecArl8$ 突变体在果实上的病斑面积显著减小(图 5A、5B)。这表明 *NecArl8* 基因缺失显著降低了病原菌的致病力,回补后致病力恢复。

2.3.4 环境胁迫反应分析

如图 6A、6B 所示,在含 0.6 mol/L NaCl、1 mol/L 山梨醇、200 μ g/mL 刚果红(Congo red,

CR)、20 μ g/mL 荧光增白剂(calcofluor white, CFW)、3 mmol/L H_2O_2 和 0.01% SDS 的培养基上,测定供试菌株的菌落直径。结果显示,与野生型菌株 PHNWZS16 相比, $\Delta NecArl8$ 在含 0.6 mol/L NaCl 和 1 mol/L 山梨醇的平板上抑制率显著升高,表明 $\Delta NecArl8$ 对高盐和高渗透压胁迫更为敏感;在含 0.01% SDS 和 200 μ g/mL CR 的平板上, $\Delta NecArl8$ 与 PHNWZS16 抑制率相当;在含 20 μ g/mL CFW 的平板上 $\Delta NecArl8$ 的抑制率显著低于 PHNWZS16,表明 $\Delta NecArl8$ 对细胞壁几丁质代谢途径胁迫更为敏感;在含 3 mmol/L H_2O_2 的平板上, $\Delta NecArl8$ 的抑制率为负值,表明其对氧化胁迫的耐受能力极显著增强,甚至表现为生长促进。结果表明, *NecArl8* 基因在菌株应对盐胁迫和渗透胁迫中发挥正调控作用,敲除后抗性减弱;在氧化胁迫中发挥负调控作用,敲除后耐氧化胁迫能力极显著增强。

2.4 RNA-seq 测序分析

PHNWZS16 (Q30: 95.125%, valid bases: 97.163%) 和 $\Delta NecArl8$ (Q30: 96.105%, valid bases: 96.298%) (CSTR 编号为 31253.11. sciencedb.j00231.00036)的主成分分析(principal

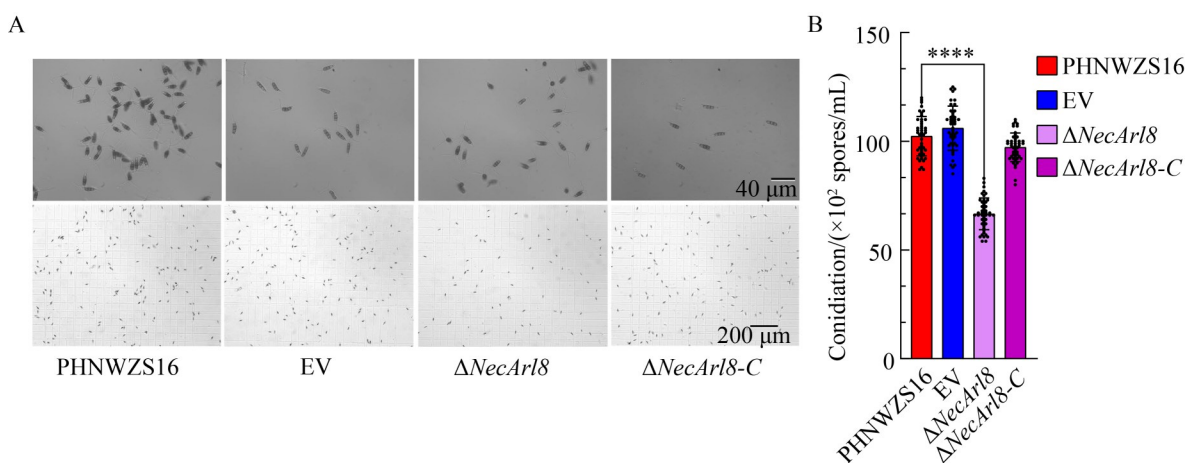


图4 分生孢子的形态和产孢量

Figure 4 Morphology and spore production of conidia. A: Morphology of conidia (Magnification: 400 $\times$, scale bar=40 μ m); B: Spore production (magnification: 100 $\times$, scale bar=200 μ m). ****: $P < 0.0001$.

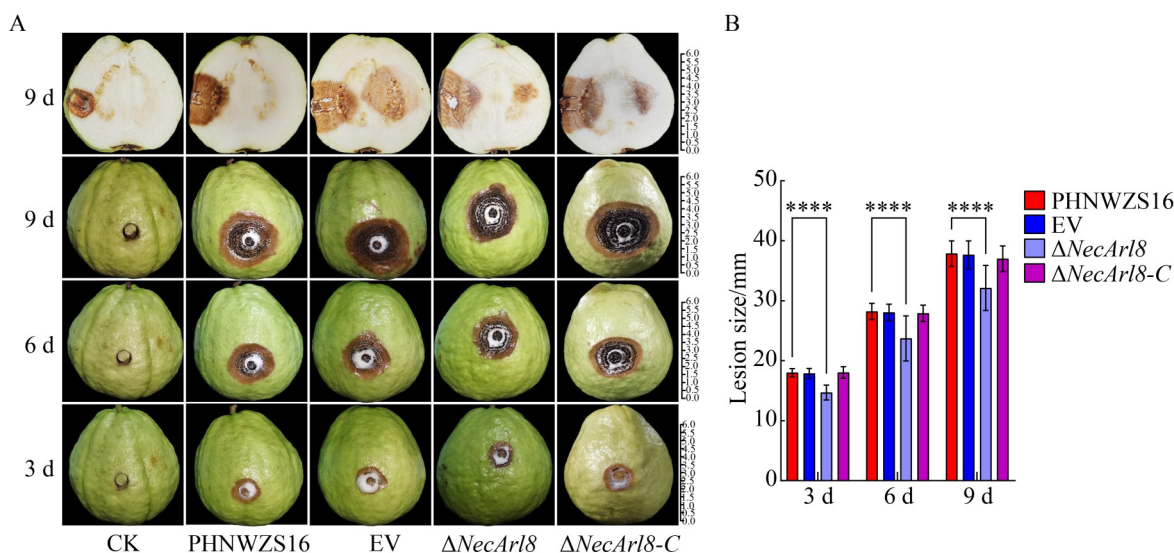


图5 供试菌株对番石榴果实致病性的测定

Figure 5 Determination of pathogenicity of the tested strains on guava fruit. A: Pathogenic lesion characteristics of guava fruit; B: Lesion size statistics. ****: $P < 0.0001$.

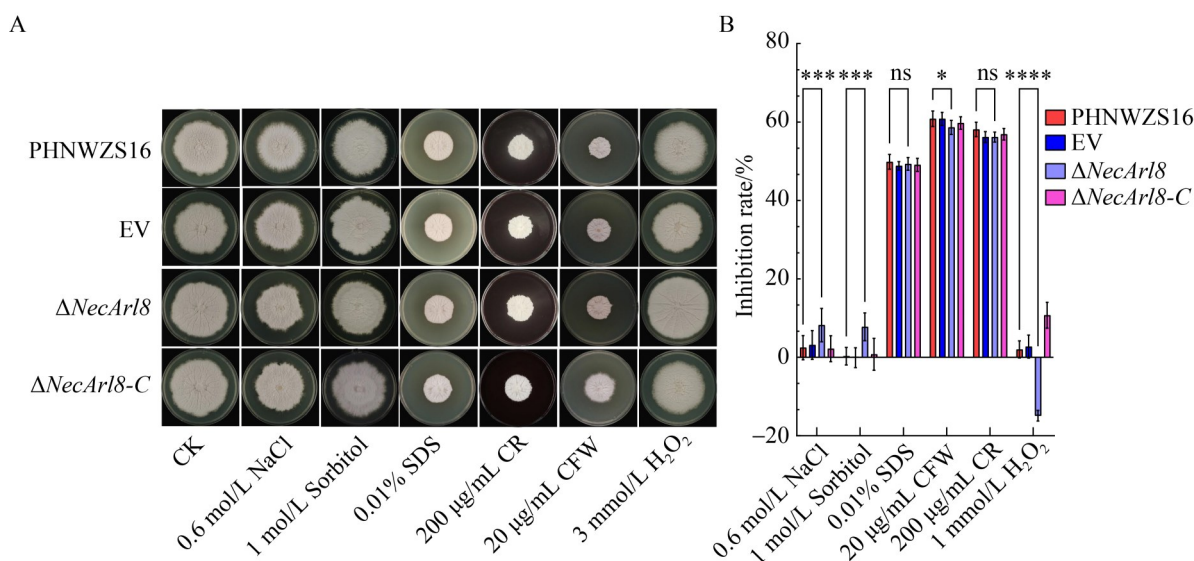
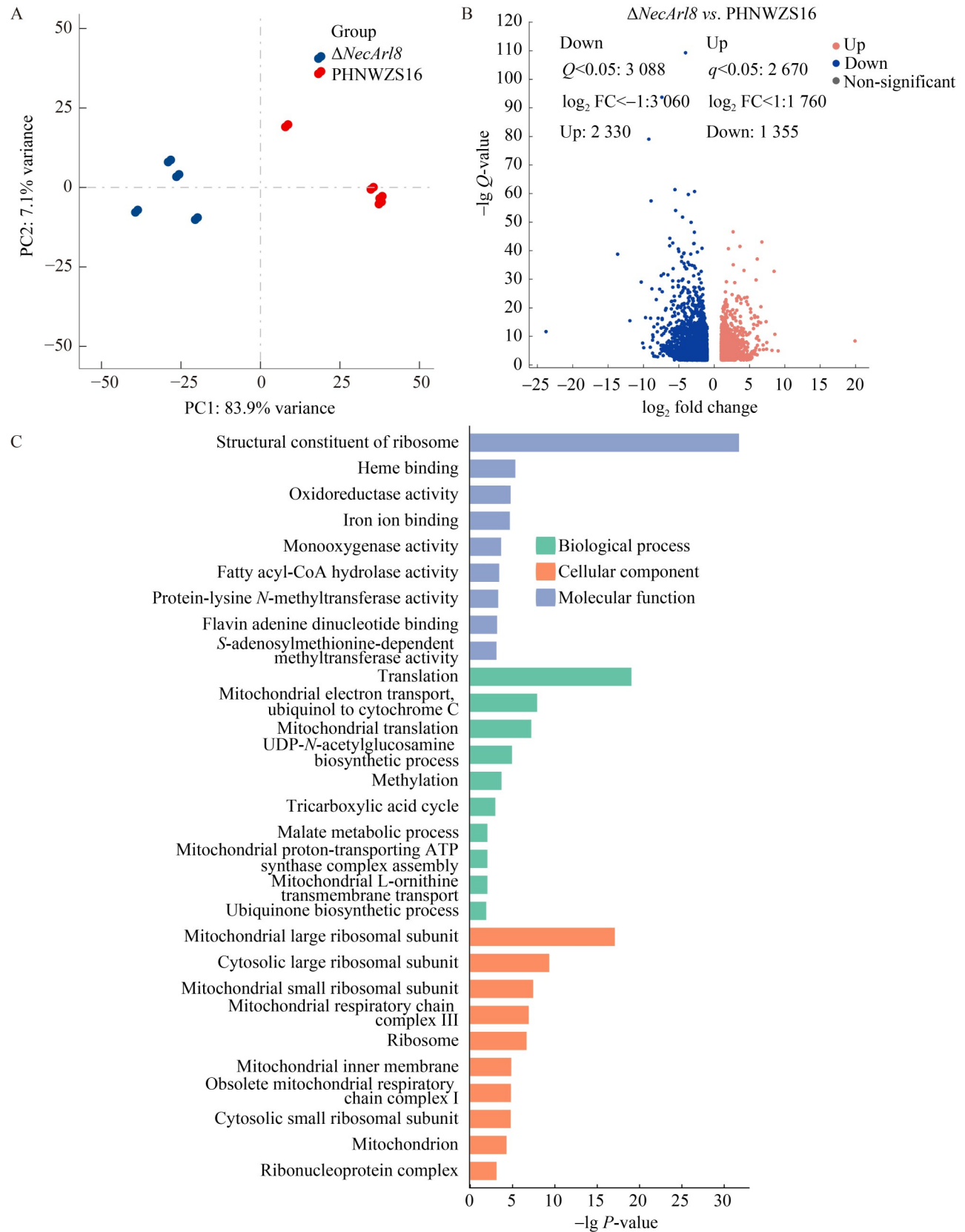


图6 野生型PHNWZS16和敲除突变体 Δ NecArl8在不同胁迫条件下的生长情况

Figure 6 Growth of wild-type PHNWZS16 and knockout mutant Δ NecArl8 under different stress conditions. A: Colony growth status; B: Colony growth inhibition rate. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

component analysis, PCA)结果显示, PC1 差异贡献度为 83.9%, PC2 差异贡献度为 7.1%, 累计解释度为 91%, 为后续转录组分析提供了可靠的数据基础(图 7A)。对差异表达基因

(differentially expressed genes, DEGs)进行分析发现, 与野生型相比 Δ NecArl8 突变体中显著下调的基因有 2 330 个, 显著上调的基因有 1 355 个(图 7B)。



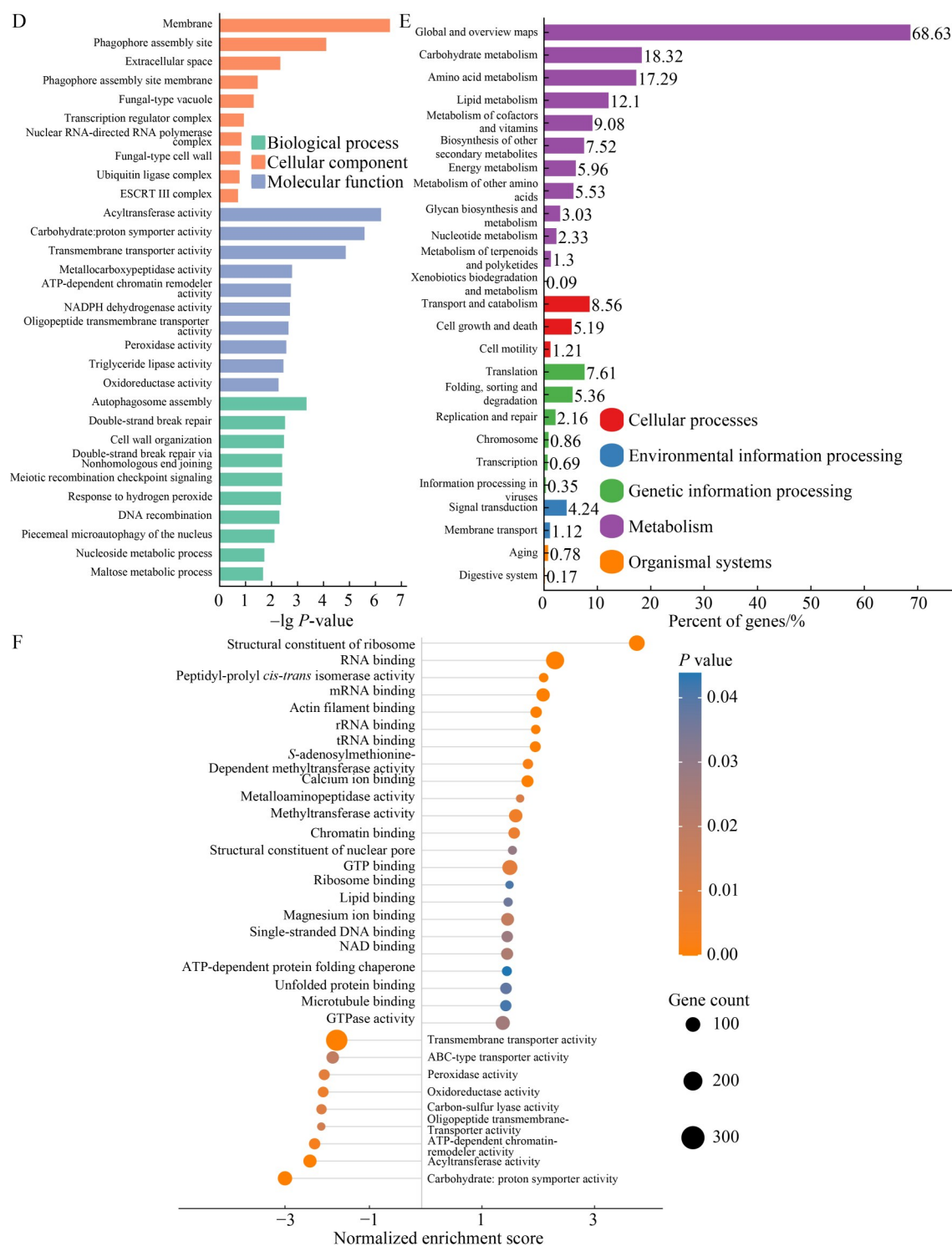


图7 RNA-seq测序的差异表达基因富集分析

Figure 7 Enrichment analysis of differentially expressed genes by RNA-seq sequencing. A: Principal component analysis of $\Delta NecArl8$ vs. PHNWZS16; B: Distribution map of differentially expressed genes; C: GO enrichment upregulation analysis; D: GO enrichment downregulation analysis; E: KEGG signaling pathway analysis; F: Gene set enrichment analysis.

基因本体(gene ontology, GO)富集分析表明, 上调基因主要影响线粒体结构完整性(mitochondrion, mitochondrial inner membrane)、能量代谢(malate metabolic process, tricarboxylic acid cycle)、核糖体结构组成(ribosome, cytosolic large ribosomal subunit)及蛋白质合成(translation, mitochondrial translation)(图 7C)。下调基因主要影响细胞自噬调控(autophagosome assembly)、遗传物质稳定(double-strand break repair, DNA recombination)、酶活性[氧化还原酶(oxidoreductase activity)、甘油三酯脂肪酶(triglyceride lipase activity)、过氧化物酶(peroxidase activity)]及物质转运活性[酰基转移酶活性(acyltransferase activity)、寡肽跨膜转运体活性(oligopeptide transmembrane transporter activity)、跨膜转运体活性(transmembrane transporter activity)、糖类:质子同向转运体活性(carbohydrate:proton symporter activity)](图 7D)。

京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析显示 DEGs 分布于 25 条通路。其中, 代谢(metabolism)模块中差异基因分布最广、占比最高, 涉及多个基础物质代谢分支: 全局调控和概览性通路(global and overview maps; 68.63%)、氨基酸代谢(amino acid metabolism; 17.29%)、能量代谢(energy metabolism; 5.96%)、脂质代谢(lipid metabolism; 12.1%)。细胞过程(cellular processes)涉及细胞生理活动的多个方面: 转运与分解代谢(transport and catabolism; 8.56%)、细胞生长与死亡(cell growth and death; 5.19%)(图 7E)。

对 DEGs 进行基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)发现, 显著上调的通路集中在核糖体结构组成(structural constituent of ribosome)、蛋白质合成(RNA binding activity)、蛋白质成熟修饰等[肽基-脯氨酸顺反异构酶活性(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity)、ATP 依赖型蛋白质折叠伴侣(ATP-dependent protein

folding chaperone)]等。下调通路的核心为跨膜转运功能广泛受到抑制[跨膜转运体活性(transmembrane transporter activity)、糖类:质子同向转运体活性(carbohydrate:proton symporter activity)、ABC 型转运体活性(ABC-type transporter activity)、寡肽跨膜转运体活性(oligopeptide transmembrane transporter activity)]; 氧化还原酶活性(oxidoreductase activity)和过氧化物酶活性(peroxidase activity)也显著下降(图 7F)。

BLOC-1 复合体(BLOC-1 complex, $\log_2$ fold change=-0.99)低表达导致内体-溶酶体转运与融合障碍; ESCRT I 复合体(ESCRT I complex, $\log_2$ fold change=0.32)高表达提示溶酶体膜可能受损。溶酶体 β -半乳糖苷酶(lysosomal beta-galactosidase, $\log_2$ fold change=1.47)、溶酶体天冬氨酸蛋白酶(lysosomal aspartic protease, $\log_2$ fold change=1.027 and 1.317)、溶酶体酸性磷酸酶(lysosomal acid phosphatase, $\log_2$ fold change=0.597)等水解酶表达量上调, 可能是为了弥补溶酶体功能缺陷并维持溶酶体内稳态。寡肽跨膜转运体(oligopeptide transmembrane transporter, $\log_2$ fold change=-2.31)和 ABC 型转运体(ABC-type transporter, $\log_2$ fold change=-1.21)等膜转运蛋白的表达异常反映出溶酶体/液泡膜功能状态改变, 跨膜运输能力显著下降。真菌型液泡蛋白(fungal-type vacuole protein, $\log_2$ fold change=-5.07 和 -2.03)等 16 个真菌型液泡相关蛋白表达量显著降低, 表明真菌型液泡的结构与功能完整性受到显著影响(CSTR 编号为 31253.11. sciencedb.j00231.00036)^[22]。其中, *NecArl8* 的缺失直接导致溶酶体/液泡功能损伤, 跨膜运输能力下降可能是古巴新拟盘多毛孢菌环境胁迫响应及致病力降低的关键因素^[23]。

2.5 RT-qPCR 验证

随机选取上述 9 个基因进行 RT-qPCR 验证, 引物如表 1 所示。这 9 个基因的 RT-qPCR 相对表达水平均与转录组测序数据趋势一致, 表明该转录组数据具有较高的可信度(图 8)。

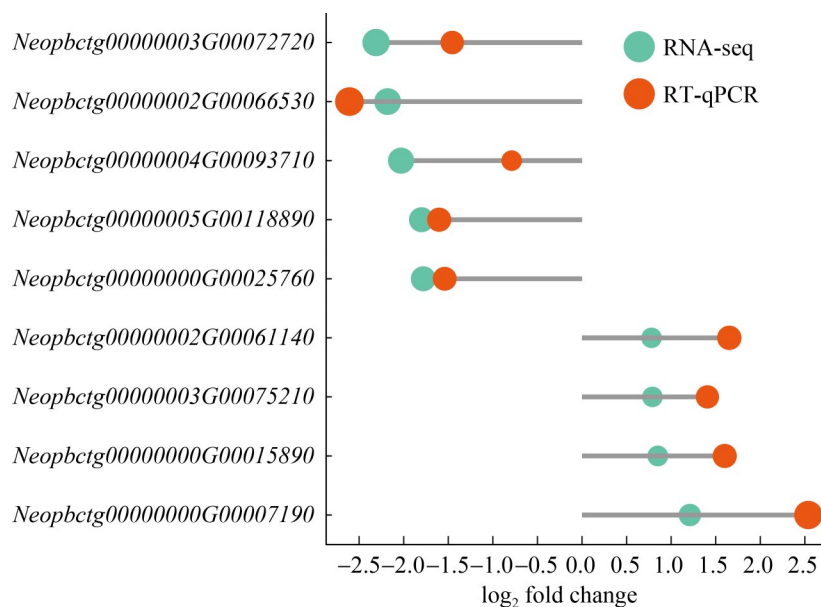


图8 九个基因的RT-qPCR表达量与RNA-seq表达量比对

Figure 8 Comparison of RT-qPCR expression levels with RNA-seq expression levels for nine genes.

3 讨论与结论

Arl8 蛋白属于 Arf/Arl 超家族, 其功能在进化上具有高度保守性, 同时在不同物种中呈现显著的功能分化, 参与多种细胞过程的调控^[24-25]。目前, Arl8 蛋白在植物病原真菌中的研究尚浅, 仅在稻瘟病菌中有初步的生长、致病性等表型描述, 发现其对稻瘟病菌的生长、发育和致病性未产生明显影响, 但尚未深入探究其功能; *NecArl8* 基因在古巴新拟盘多毛孢菌中的表现与稻瘟病菌中的功能存在一定差异, 可能是物种间生态位与细胞功能需求的不同导致 Arl8 蛋白的功能呈现适应性分化^[26]。 Δ *NecArl8* 突变体表现出抗氧化胁迫能力极显著增强、长期培养后出现大量空泡细胞及致病力下降等表型。RNA-seq 测序结果分析表明, *NecArl8* 基因敲除后基础代谢通路受到广泛影响。线粒体呼吸链复合物 I/III/IV、NADH 脱氢酶活性及琥珀酸脱氢酶活性的上调表达增强了能量代谢, 提高了氧化胁迫耐受能力。液泡膜结构相关蛋白及各类膜转运蛋白的显著下调表

达导致液泡结构和功能受损。菌丝经长时间培养后, 未及时融合降解的自噬体、晚期内体及异常囊泡累积形成大量空泡细胞。液泡功能缺陷引发一系列代偿机制以弥补其功能不足; 代谢紊乱和分解能力下降直接导致古巴新拟盘多毛孢菌致病力及稳态维持能力降低^[27]。

通过构建 *NecArl8* 基因异位回补菌株 (Δ *NecArl8-C*), 经 RT-qPCR 验证其相对表达量有所提高, 推测可能由异位回补所致。然而, 致病力和抗胁迫能力均恢复至正常水平, 长期培养实验中空泡情况有所缓解, 但菌丝破损加剧, 有待进一步研究是否与自噬通路激活有关。系统发育树分析表明, *Arl8* 基因在子囊菌中具有高度保守性^[28-29]。其功能表现是古巴新拟盘多毛孢菌中的个体特性还是子囊菌中的群体共性尚不明确, 有待在更多真菌中开展深入研究加以佐证。

综上所述, 本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术及 Split Marker 同源重组技术构建了古巴新拟盘多毛孢菌 *NecArl8* 基因敲除突变体 Δ *NecArl8* 及回补突变体 Δ *NecArl8-C*。通过营养

生长、环境胁迫响应、致病力评估及差异表达基因富集分析, 推测 *NecArl8* 基因是古巴新拟盘多毛孢菌中维持液泡正常功能的重要因子, 通过调控细胞稳态、自噬启动及跨膜运输影响菌体的环境适应能力与致病能力。后续可针对其激活自噬的机制开展深入研究, 进一步揭示细胞自噬与病原菌致病性之间的关系。本研究初步揭示了 *NecArl8* 在古巴新拟盘多毛孢菌中的功能, 为后续研究奠定了理论基础。

作者贡献声明

毛青山: 方法论、完成实验、数据收集及分析、验证, 撰写文章; 王焕惟: 方法论、数据分析、审阅; 霍思燕: 方法论、数据分析; 董一鸣: 数据收集及分析; 缪卫国: 获取基金、项目管理、提供资源; 刘文波: 提出概念、获取基金、项目管理、提供资源、审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Xun WZ, Gong B, Liu XX, Yang XJ, Zhou X, Jin LH. Antifungal mechanism of phenazine-1-carboxylic acid against *Pestalotiopsis kenyana*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(14): 11274.
- [2] Rotondo F, Klass TL, Scott K, McCartney M, Jacobs JM, Lewis Ivey ML. First report of *Neopestalotiopsis* disease in Ohio caused by an emerging and novel species of *Neopestalotiopsis* on strawberry[J]. Plant Disease, 2023, 107(3): 940.
- [3] 姚欢格, 胡宇欣, 惠欣雨, 牛晓敏, 邵远志. 莲雾采后病原菌的分离鉴定及抑制剂的筛选[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2216-2229.
Yao HG, Hu YX, Hui XY, Niu XM, Shao YZ. Isolation and identification of pathogens from post-harvest fruits of *Syzygium samarangense* and screening of effective inhibitors[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2216-2229 (in Chinese).
- [4] 李晶, 谢开泽, 张超, 谢昌平. 槟榔新拟盘多毛孢叶斑病菌的鉴定及生物学特性[J]. 热带作物学报, 2023, 44(8): 1671-1678.
Li J, Xie KZ, Zhang C, Xie CP. Identification and biological characteristics of the pathogen causing *Neopestalotiopsis* leaf spot disease on *Areca catechu*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023, 44(8): 1671-1678 (in Chinese).
- [5] 陈洪彬, 安莹莹, 陈蕾伊, 陈艺晖, 蒋璇靓, 林育钊. 福建番石榴环斑病菌的分离鉴定、生物学特性及抑制剂筛选[J]. 果树学报, 2024, 41(4): 738-749.
Chen HB, An YY, Chen LY, Chen YH, Jiang XL, Lin YZ. Isolation, identification, biological characteristics and inhibitors screening of pathogen causing ring rot disease of guava fruit in Fujian Province[J]. Journal of Fruit Science, 2024, 41(4): 738-749 (in Chinese).
- [6] 张舒媛. 由新拟盘多毛孢真菌引起的草莓病害的防治研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2024.
Zhang SY. The study on the control of strawberry diseases caused by *Neopestalotiopsis clavispora*[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2024 (in Chinese).
- [7] Darapanit A, Boonyuen N, Leesutthiphonchai W, Nuankaew S, Piasai O. Identification, pathogenicity and effects of plant extracts on *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis* causing fruit diseases[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 22606.
- [8] Li TT, Guo YS. ADP-ribosylation factor family of small GTP-binding proteins: their membrane recruitment, activation, crosstalk and functions[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022, 10: 813353.
- [9] Donaldson JG, Jackson CL. Arf family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2011, 12(6): 362-375.
- [10] 马裕鑫. 寡聚节丛孢 Arf-GAP 蛋白功能的初步研究[D]. 昆明: 云南大学, 2020.
Ma YX. Functional analysis of the Arf-GAP proteins in *Arthrobotrys ologospora*[D]. Kunming: Yunnan University, 2020 (in Chinese).
- [11] Wang KM, Wang SY, Wang T, Xia Q, Xia ST. The *Sclerotinia sclerotiorum* ADP-ribosylation factor 6 plays an essential role in abiotic stress response and fungal virulence to host plants[J]. Journal of Fungi, 2024, 10(1): 12.
- [12] Khatter D, Sindhwani A, Sharma M. Arf-like GTPase Arl8: moving from the periphery to the center of lysosomal biology[J]. Cellular Logistics, 2015, 5(3): e1086501.
- [13] 赵京凤. 小 G 蛋白 ARL8A 和 ARL8B 作为抗肿瘤靶点的可行性研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
Zhao J F. Feasibility study of small G proteins ARL8A and ARL8B as anti-tumor targets[D]. Peking Union Medical College, 2018 (in Chinese).
- [14] 曹志然. 探索拟南芥 Arf-like GTPase ARLA1A 的细胞生物学功能及在 ABA 胁迫响应中的作用机理[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020.
Cao ZR. Explore the cytological function of Arf-like GTPase ARLA1A in *Arabidopsis* and the roles in ABA response[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2020 (in Chinese).
- [15] Jurénas D, Rey M, Byrne D, Chamot-Rooke J, Terradot L, Cascales E. *Salmonella* antibacterial Rhs polymorphic toxin inhibits translation through ADP-ribosylation of EF-Tu P-loop[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(22): 13114-13127.

- [16] Herrera A, Satchell KJF. Cross-kingdom activation of *Vibrio* toxins by ADP-ribosylation factor family GTPases[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(24): e00278-20.
- [17] Nishikiori M, Mori M, Dohi K, Okamura H, Katoh E, Naito S, Meshi T, Ishikawa M. A host small GTP-binding protein ARL8 plays crucial roles in tobamovirus RNA replication[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(12): e1002409.
- [18] Zhang SP, Yang LN, Li LW, Zhong KL, Wang WH, Liu MX, Li Y, Liu XY, Yu R, He JL, Zhang HF, Zheng XB, Wang P, Zhang ZG. System-wide characterization of MoArf GTPase family proteins and adaptor protein MoGga1 involved in the development and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*[J]. *mBio*, 2019, 10(5): e02398-19.
- [19] Dautt-Castro M, Rosendo-Vargas M, Casas-Flores S. The small GTPases in fungal signaling conservation and function[J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1039.
- [20] Huang YT, Wang HW, Huo SY, Lu JP, Norvienyeku J, Miao WG, Qin CX, Liu WB. Comparative mitogenomics analysis revealed evolutionary divergence among *Neopestalotiopsis* species complex (Fungi: *Xylariales*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(6): 3093.
- [21] Wang ZW, Tyler BM, Liu XL. Protocol of *Phytophthora capsici* transformation using the CRISPR-Cas9 system[M]// Ma WB, Wolpert T. *Plant Pathogenic Fungi and Oomycetes: Methods and Protocols*. New York: Springer New York, 2018: 265-274.
- [22] Settembre C, Perera RM. Lysosomes as coordinators of cellular catabolism, metabolic signalling and organ physiology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2024, 25(3): 223-245.
- [23] Wang CY, Wang YX, Wang Y, Wang ZD, Zhang LY, Liang YC, Chen L, Zou SS, Dong HS. The ADP-ribosylation factor-like small GTPase FgArf11 participates in growth, pathogenicity and DON production in *Fusarium graminearum*[J]. *Fungal Biology*, 2020, 124(11): 969-980.
- [24] Boehi F, Manetsch P, Hottiger MO. Interplay between ADP-ribosyltransferases and essential cell signaling pathways controls cellular responses[J]. *Cell Discovery*, 2021, 7: 104.
- [25] Chen PW, Gasilina A, Yadav MP, Randazzo PA. Control of cell signaling by Arf GTPases and their regulators: focus on links to cancer and other GTPase families[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2022, 1869(2): 119171.
- [26] Burd CG, Strohlic TI, Setty SRG. Arf-like GTPases: not so Arf-like after all[J]. *Trends in Cell Biology*, 2004, 14(12): 687-694.
- [27] Raimundo N, Fernández-Mosquera L, Yambire KF, Diogo CV. Mechanisms of communication between mitochondria and lysosomes[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2016, 79: 345-349.
- [28] Li FL, Guan KL. The Arf family GTPases: regulation of vesicle biogenesis and beyond[J]. *BioEssays*, 2023, 45(6): 2200214.
- [29] Yang L, Li XM, Ma YX, Zhang KQ, Yang JK. The Arf-GAP proteins AoGcs1 and AoGts1 regulate mycelial development, endocytosis, and pathogenicity in *Arthrobotrys oligospora*[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(5): 463.